



UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL
PROGRAMA DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

FERNANDA ARPINI SOUZA

PROCESSOS FERMENTATIVOS EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
UTILIZANDO A LEVEDURA *YARROWIA LIPOLYTICA* QU69

LARANJEIRAS DO SUL

2018

PROGRAD/DBIB - Divisão de Bibliotecas

Souza, Fernanda Arpini

PROCESSOS FERMENTATIVOS EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
UTILIZANDO A LEVEDURA YARROWIA LIPOLYTICA QU69/ Fernanda
Arpini Souza. -- 2018.

56 f.

Orientador: Thiago Bergler Bitencourt.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da
Fronteira Sul, Programa de Pós-Graduação em Mestrado em
Ciência e Tecnologia de Alimentos - PPGCTAL, Laranjeiras
do Sul, PR, 2018.

1. Leveduras. 2. Biotransformação. 3. Cascas de
mandioca. 4. Reaproveitamento. 5. Turbidimetria. I.
Bitencourt, Thiago Bergler, orient. II. Universidade
Federal da Fronteira Sul. III. Título.

FERNANDA ARPINI SOUZA

**PROCESSOS FERMENTATIVOS EM RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS
UTILIZANDO A LEVEDURA *YARROWIA LIPOLYTICA* QU69**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal da Fronteira Sul, como requisito parcial para obtenção do título de mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Thiago Bergler Bitencourt

LARANJEIRAS DO SUL

2018

FERNANDA ARPINI SOUZA

TÍTULO: "Processos Fermentativos Utilizando a Levedura *Yarrowia Lipolytica* QU69".

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* - **Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos** – PPGCTAL da Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS para obtenção do título de Mestra em Ciência e Tecnologia de Alimentos, defendido em 22/06/2018.

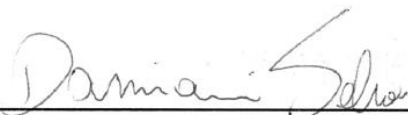
Presidente da Banca: Prof. Dr. Thiago Bergler Bitencourt

Aprovado em: 22 / 06 / 2018

BANCA EXAMINADORA



Dr. Thiago Bergler Bitencourt/UFFS



Dr. Danianni Sebrão/UDESC



Dr. Marcelo Alves Moreira/UDESC

Laranjeiras do Sul/PR, junho de 2018

AGRADECIMENTOS

A Deus,

A minha família, Pai, Mãe, Ricardo, Felipe e Guilherme, que sempre me apoiaram e compreenderam meus momentos de ausência.

Ao meu namorado Alex, que sempre me incentivou, entendeu e aconselhou em todos os momentos e que, apesar da distância sempre se fez presente.

Meu agradecimento especial ao meu professor orientador Thiago Bergler Bitencourt pela confiança, amizade, incentivo, orientação e oportunidade de aprendizado.

A professora Patrícia Valente - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UFRGS que gentilmente cedeu cepas da levedura utilizada no trabalho.

Aos membros da banca Damianni Sebrão e Marcelo Alves Moreira pela disponibilidade da participação e contribuições feitas ao trabalho.

A toda equipe dos laboratórios da UFFS – Laranjeiras do Sul que sempre estiveram dispostos a auxiliar e incentivar, em especial às colegas Silvia Tormen e Marli Nidermeyer que se disponibilizaram a realizar minhas atividades enquanto estava cursando as disciplinas do programa.

A todos os professores do programa que sempre estiveram dispostos a uma conversa, conselhos e palavras de incentivo, em especial a professora Larissa Canhadas Bertan pelo apoio e oportunidade de realização do estágio de docência.

A equipe de iniciação científica do prof. Thiago Bitencourt que me auxiliou nos trabalhos e realização das análises (Brenda, Caroline, Davi, Higor e Melissa).

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

Diante do desenvolvimento constante da biotecnologia e a busca por processos em que seja possível agregar valor comercial a produtos até então descartados, surge a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais em processos de bioconversão. Estes processos são realizados por micro-organismos e possuem como vantagens o baixo custo, fácil controle e a não utilização de produtos químicos. A levedura *Yarrowia lipolytica* é utilizada em processos de bioconversão para produção de diversos produtos de interesse industrial. Para estimar o número de células presentes nos inóculos que serão utilizados em processos fermentativos os dois métodos mais utilizados são a escala de McFarland e a câmara de Neubauer, que foram originalmente desenvolvidos para contagem de bactérias e células sanguíneas, respectivamente, o métodos citados possuem interpretação subjetiva. Buscando aperfeiçoar os métodos de contagem de células da levedura *Yarrowia lipolytica* QU69, para utilização em bioprocessos foi utilizada a escala de McFarland associada à espectrofotometria UV-Vis para estimar o número de células presentes em suspensões. O método se mostrou bastante rápido, confiável e reprodutível, podendo ser aplicado em análises de rotina e experimentos de aulas. No processo de bioconversão utilizando as células da levedura *Yarrowia lipolytica* QU69 a biomassa produzida foi avaliada quanto a produção de proteínas e lipídios com diversas fontes de carbono oriundas de resíduos agroindustriais e buscou-se a otimização do processo. Foram alcançados valores expressivos quando utilizado resíduo de casca de mandioca como fonte de carbono, meio de suplementação contendo uréia e processo conduzido sob agitação tipo dubnoff a 100 rpm e temperatura de 40°C.

Palavras-chave: Leveduras. Biotransformação. Cascas de mandioca. Proteínas heterólogas. Biotecnologia. Reaproveitamento. Câmara de Neubauer. Turbidimetria. Bioconversão. Absorbância

ABSTRACT

The constant development of biotechnology and the search for processes in which it is possible to add commercial value to previously discarded products, the possibility arises of the use of agroindustrial residues in bioconversion processes. These processes are performed by microorganisms and have the advantages of low cost, easy control and non-use of toxic chemicals. The Yeast such, *Yarrowia lipolytica* was used in bioconversion processes for the production of various products of industrial interest. To estimate the number of cells present in the inoculum that will be used in fermentative processes, the two most used methods are the McFarland scale and the Neubauer chamber, which were originally developed for counting bacteria and blood cells, respectively, subjective. In order to improve the yeast cell counting methods *Yarrowia lipolytica* QU69, was use in bioprocesses the McFarland scale associated with UV-Vis spectrophotometry and used to estimate the number of cells present in suspensions. The method proved to be very fast, reliable and reproducible, and could be applied in routine analyzes and classroom experiments. In the bioconversion process using yeast cells *Yarrowia lipolytica* QU69 the biomass produced was evaluated by the production of proteins and lipids with several carbon sources from agroindustrial waste and the process was optimized. Significant values were obtained when using manioc as a carbon source, urea-containing supplementation medium and a process conducted under dubnoff shaking at 100 rpm and a temperature of 40 ° C.

Key words: Yeasts. Biotransformation. Manioc peels. Heterologous proteins. Biotechnology. Recycling. Neubauer chamber. Turbidimetry. Bioconversion. Absorbance

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1:

Tabela 1 – Relação entre a turbidez dos tubos e a concentração estimada de bactérias.....	23
Tabela 2 – Absorbância (500nm) obtida para cada tubo na escala McFarland.....	25
Tabela 3 – Absorbância (500nm) para contagem das células de <i>Yarrowia lipolytica</i> QU69 realizada em câmara de Neubauer	26

ARTIGO 2:

Tabela 1 – Resultados obtidos quanto ao teor proteico das fontes de carbono <i>in natura</i> e da biomassa acompanhados da variação proteica após o processo de bioconversão.....	35
Tabela 2 – Resultados obtidos quanto ao teor lipídico das fontes de carbono <i>in natura</i> e da biomassa acompanhados da variação lipídica após o processo de bioconversão.....	38
Tabela 3 – Perfil dos ácidos graxos presentes nas fontes de carbono <i>in natura</i> e na biomassa após o processo de bioconversão.....	41

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1:

Figura 1 – Câmara de Neubauer com destaque para seus três diferentes quadrantes de contagem	22
Figura 2 – Escala padrão de McFarland.....	23
Figura 3 – Gráfico da absorbância x número de células de levedura.....	26
Figura 4 – Resultados da contagem das células de <i>Yarrowia lipolytica</i> QU69 relacionado com a absorbância das suspensões padronizadas visualmente de acordo com McFarland.....	27

ARTIGO 2:

Figura 1 – Otimização do processo de produção de proteínas por <i>Y. lipolytica</i> QU69 em função da fonte de nitrogênio, temperatura agitação.....	44
Figura 2 – Perfil da produção de proteínas por <i>Y. lipolytica</i> QU69 ao longo de 11 dias acompanhado do incremento proteico.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

GYP – Glucose - Yeast Extract - Peptone

P.A – para análise

UFC / mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro

LISTA DE SIGLAS

FAO – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FDA – Food and Drug Administration

GRAS – Generally Recognized as Safe

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
CAPÍTULO 1	14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 Lipídios Microbianos	14
1.2 Proteínas heterólogas	15
1.3 <i>Yarrowia lipolytica</i>	16
1.4 Bioconversão	17
1.5 Tipos de Fermentação	18
1.5.1 Fermentação em estado Sólido (FES)	18
1.5.2 Fermentação Submersa (FS)	18
CAPÍTULO 2: USO DE ESCALA DE MCFARLAND ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA UV-Vis PARA CONTAGEM DE CÉLULAS DE <i>YARROWIA</i> <i>LIPOLYTICA</i> QU69	19
Resumo	19
Abstract	20
1 INTRODUÇÃO	21
2 MATERIAIS E MÉTODOS	22
2.1 Métodos gerais	22
2.2 Preparo da Escala padrão de McFarland	23
2.3 Preparo do inóculo e contagem das células	23
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4 CONCLUSÃO	27
5 REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 2: BICONVERSÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR <i>YARROWIA</i> <i>LIPOLYTICA</i> QU69: ANÁLISE DA PRODUÇÃO PROTEICA, LIPÍDICA E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO	29
Resumo	29
Abstract	30
1 INTRODUÇÃO	31
2 MATERIAIS E MÉTODOS	32
2.1 Equipamentos e Reagentes	32
2.2 Preparo do inóculo e fermentação	32
2.3 Escolha e preparo dos resíduos	33
2.4 Métodos analíticos	33

2.4.1 Determinação de proteínas totais (Kjeldahl)	33
2.4.2 Determinação de lipídios (Bligh-Dyer)	34
2.4.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	34
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 Produção de proteínas	35
3.2 Produção de lipídios microbianos	37
Análise do perfil dos ácidos graxos produzidos	39
3.3 Otimização do processo de produção de proteínas	43
4 CONCLUSÃO	47
5 REFERÊNCIAS	47
6 CONCLUSÕES GERAIS	52
7 REFERÊNCIAS GERAIS	53
PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA	56
Resumos publicados	56

1 INTRODUÇÃO GERAL

A geração de resíduos e subprodutos é inerente ao processo de beneficiamento de qualquer setor produtivo principalmente no que se refere ao processamento de frutas, vegetais e cereais. Com o aumento da conscientização ecológica, fica evidenciado um grande desafio para as próximas décadas que é equilibrar produção, crescimento econômico, igualdade social e sustentabilidade ambiental. Devido a quantidade de nutrientes disponíveis nos resíduos sólidos agroindustriais estes podem ser convertidos por micro-organismos e transformados em produtos comerciais ou matérias-primas para processos secundários.

Micro-organismos têm a habilidade de utilizar material orgânico com pouco conteúdo proteico e transformá-lo em alimento rico em proteínas por meio da bioconversão. A levedura *Yarrowia lipolytica* possui capacidade de utilizar diversos substratos, para a produção de biomassa microbiana, é capaz de produzir metabólitos importantes, além de possuir intensa atividade secretora, o que justifica o seu interesse industrial.

A bioconversão dos resíduos agrícolas e da indústria de alimentos tem recebido atenção e com isso, se destaca o papel da fermentação no aproveitamento de resíduos sólidos visando à síntese de diversos compostos de alto valor agregado e de grande interesse industrial. O uso da fermentação para transformação dos resíduos possui vantagens como baixo o custo de processo, facilidade da aplicação de micro-organismos, melhora a digestibilidade, melhora o valor nutricional, possui fácil controle e não utiliza produtos químicos.

A fermentação utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* se apresenta como uma tecnologia capaz de propor caminhos alternativos para os resíduos gerados, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, agregar valor a essas matérias-primas, por meio da produção de substâncias de interesse econômico.

2 OBJETIVOS

2.1 *Objetivo geral*

Utilizar a levedura *Yarrowia lipolytica* QU69 em processos de bioconversão buscando agregar valor nutricional a resíduos agroindustriais.

2.2 *Objetivos Específicos*

- Padronizar o método de utilização da escala de McFarland associada a espectrometria UV-Vis para a utilização com a levedura *Yarrowia lipolytica*;
- Caracterizar resíduos agroindustriais quanto ao teor de proteínas e lipídios;
- Realizar processos de bioconversão utilizando resíduos agroindustriais e analisar a biomassa produzida quanto aos teores proteico e lipídico;
- Realizar processo de otimização da bioconversão buscando melhorar os resultados.

CAPÍTULO 1

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Lipídios Microbianos

Vários autores têm estudado a síntese de lipídios por via microbiana, grande parte deles voltados para a possibilidade de obter alternativa para a carência de alimentos e outra, para a produção de energia. Como supridores de lipídios, os micro-organismos oferecem algumas vantagens potenciais em relação aos animais e vegetais como, por exemplo, a grande rapidez de geração, menor área de produção para uma mesma massa de material graxo e melhor controle da produção e do produto.

Tratando-se de alimentação, a ingestão de ácidos graxos insaturados é importante pois são essenciais dado ao fato de não serem sintetizados pelo organismo, necessitando assim, terem sua demanda metabólica suprida pela ingestão de alimentos. Os principais grupos recomendados nas dietas alimentares são os ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados que apresentam características antioxidantes e auxiliam na prevenção de doenças cardiovasculares (MORALES, 2016).

Nos micro-organismos, os lipídeos são sintetizados durante a fase de crescimento como parte de seu processo metabólico e como reserva de carbono. Os lipídios microbianos denominados “Single-cell-oil” (SCO) têm sido considerados uma alternativa interessante, pois são similares em termos da composição em ácidos graxos aos óleos vegetais e animais e possuem a vantagem de serem produzidos a partir de substratos de baixo custo como glicerol bruto proveniente da produção de biodiesel, resíduos de gordura animal rica em estearina e óleos vegetais como o milho (BELO, 2013).

Dependendo das condições ambientais, as células de micro-organismos são capazes de mobilizar ácidos graxos livres ou triacilgliceróis e ésteres de esteróis em corpos lipídicos, que consistem num núcleo hidrofóbico formado a partir de lipídios neutros e rodeado por uma monocamada de fosfolipídios com algumas proteínas incorporadas. Os lipídios podem acumular-se através de duas vias diferentes: síntese de novo, envolvendo a produção em condições de precursores de ácidos graxos, tais como acetil e malonil-CoA e sua integração no lipídio de armazenamento biossintética e a via de acumulação ex novo, envolvendo a absorção de ácidos graxos, óleos e triacilgliceróis do meio de cultura e a sua acumulação

numa forma inalterada ou modificada dentro da célula (BEOPOULOS; CHARDOT; NICAUD, 2009).

Os processos de síntese de lipídios por micro-organismos tornam-se bastante interessantes, já que são capazes de sintetizar unicamente um ácido graxo insaturado ou em concomitância com outro ácido graxo insaturado em menor quantidade e que esses ácidos graxos podem ser utilizados como suplemento alimentar (COX e NELSON, 2011).

1.2 Proteínas heterólogas

Proteínas heterólogas ou proteínas de organismos unicelulares são proteínas extraídas a partir de cultivos de biomassa microbiana, e podem ser utilizadas para suprimento de proteína de um alimento básico por substituição de fontes de alto custo para diminuir o efeito da escassez de proteínas (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

A proteína microbiana apresenta considerável digestibilidade, podendo ser utilizada como fonte adicional de proteína a ser incorporada na dieta. O consumo de proteínas está relacionado às necessidades de ingestão de aminoácidos essenciais. Esses nutrientes exercem papel determinante na eficiência do metabolismo do organismo, estando diretamente ligados à construção de proteínas, regulação de processos celulares, precursores de moléculas, entre outros. São considerados aminoácidos essenciais, pois, não podem ser sintetizados pelos organismos e, conseqüentemente, devem ser supridos mediante dieta adequada (MORALES, 2016).

O micro-organismo ideal para a produção de proteínas unicelulares deve possuir uma série de características tecnológicas, entre elas alta taxa de crescimento específico e rendimento de biomassa, alta afinidade pelo substrato, poucas necessidades nutricionais, habilidade em desenvolver alta densidade celular, capacidade para modificações genéticas, composição balanceada de proteínas e lipídios e baixo teor de ácidos nucléicos, boa digestibilidade e atoxicidade (ROEPCKE; VANDENBERGHE; SOCCOL, 2011).

Leveduras certificadas como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) podem ser usadas na alimentação humana e animal, sob diversas formas e para diversas finalidades. As leveduras são reconhecidas mundialmente como excelentes fontes de proteínas, vitaminas do complexo B, minerais essenciais e fibra dietética. (SANTOS, 2009).

Diversos estudos têm sido conduzidos para viabilizar a utilização de subprodutos agroindustriais na alimentação animal. A procura por alimentos não convencionais tem

aumentado principalmente devido aos frequentes aumentos nos preços dos grãos e fontes proteicas vegetais. Dentre os produtos que podem substituir os suplementos proteicos convencionais na alimentação animal destacam-se os micro-organismos (algas, bactérias, bolores e leveduras), considerados fontes de proteína unicelular.

Na área da produção de proteínas, as leveduras oferecem uma série de vantagens como sistemas de expressão para proteínas complexas e possuem vantagem sobre as bactérias por serem maiores e possuir facilidade de manipulação e capacidade de crescimento (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004). Os perfis de fermentação das leveduras são estabelecidos e estes organismos são capazes de crescer rapidamente em meios simples com densidade celular elevada a um custo inferior ao de qualquer outro sistema de fermentação (DOMÍNGUEZ et al., 1998).

1.3 *Yarrowia lipolytica*

O gênero *Yarrowia* compreende um grupo de fungos leveduriformes encontrados em diversos ecossistemas. Podem ser encontradas e isoladas em locais contaminados com óleos e plantas (LEDESMA-AMARO et al., 2016); variedades de queijos brie, feta e cheddar e produtos avícolas (ZINJARDE, 2014); solo e água do mar (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW, 2014), entre outros.

Geralmente são dimórficas, podendo aparecer microscopicamente na forma de leveduras apresentando células alongadas ou ovaladas, medindo em média 3 a 7 µm de largura e 3 a 14 µm de comprimento, na forma de micélio apresentando pseudohifas ou hifas verdadeiras. Esta levedura é bastante diferente dos modelos celulares mais estudados como *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* que são consideradas leveduras “convencionais”, em relação à fisiologia, genética e biologia molecular e, portanto, pertence ao grupo das leveduras “não-convencionais”, sendo a espécie mais estudada desse grupo (BARTH e GAILLARDIN, 1997).

Yarrowia lipolytica é classificada como GRAS (*Generally Recognized as Safe*) pela *Food and Drug Administration* (FDA), é aeróbia estrita e considerada uma das leveduras não convencionais com maior potencial em aplicações biotecnológicas (LIU; JI; HUANG, 2015).

É capaz de assimilar hidrocarbonetos e compostos de petróleo (CSUTAK et al., 2015); glicose, manitol, acetato, piruvato, citrato, lactato (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW, 2014); e diversos substratos hidrofóbicos (ZHU; JACKSON, 2015), (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004).

Esta levedura é utilizada em diversos processos e sua biomassa já foi analisada e testada em diversas áreas. Sutherland, Cornelison e Crow (2014) testaram a levedura para produção de proteínas unicelulares, aromas, bioemulsificantes, lipases e ácido cítrico; foi utilizada para produção de proteínas unicelulares e ácidos graxos (HAMZA et al., 2017), ácido cítrico (MACHADO et al., 2015), biorremediação e tratamento de efluentes petróleo (CSUTAK et al., 2015), proteases, lipases, ácidos orgânicos (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009) e diversas outras substâncias de acordo com a variação da fonte de carbono e do meio de suplementação utilizados (LIU; JI; HUANG, 2015).

1.4 Bioconversão

A utilização de micro-organismos para a produção de compostos de interesse comercial se dá através de processos de bioconversão. Com a utilização de tecnologias adequadas a biotransformação beneficia e aumenta a biodisponibilidade de nutrientes com o uso de fungos reconhecidamente comestíveis. Ensaio e métodos podem avaliar o potencial do uso de resíduos e co-produtos da agroindústria e proporcionar o melhor aproveitamento destes e, conseqüentemente, aumentar a disponibilidade de alimentos com valores nutricionais adequados (MORALES, 2016).

Micro-organismos têm a habilidade para utilizar material orgânico com pouco conteúdo proteico e transformá-lo em alimento rico em proteínas. Este fenômeno foi utilizado na Alemanha durante a Primeira Guerra Mundial quando o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* foi explorado para consumo humano (SANTOS, 2009).

Vários resíduos agroindustriais têm sido utilizados para produção de proteína oriunda de micro-organismos para alimentação de aves e ruminantes (RAJOKA et al., 2006). Dentre os substratos que são comumente utilizados para produção de biomassa, se destacam melaços, resíduos e excedentes de frutas, soros de indústrias de laticínios e hidrocarbonetos de petróleo.

A bioconversão de resíduos agrícolas e industriais para produção de alimentos ricos em proteínas possui ainda como vantagem o fato do produto ter baixo custo (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000). Espécies de fungos são cultivadas em diferentes substratos, geralmente resíduos de baixo custo, com suplementação de carbono e nitrogênio para o crescimento.

Na bioconversão, resíduos podem alcançar maiores concentrações nutricionais e serem utilizados como suplemento nutricional, sendo uma alternativa para alimentação animal. A produção de ração animal via crescimento microbiano pode vir a ser uma solução para os problemas de deficiência alimentar existentes (ARAÚJO et al., 2009).

1.5 Tipos de Fermentação

As fermentações podem ser classificadas conforme a quantidade de água presente no meio, e são classificadas como fermentação submersa (FS) ou fermentação em estado sólido (FES). A produção de biomassa microbiana pode ser realizada tanto em processo submerso como em estado sólido (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

1.5.1 Fermentação em estado Sólido (FES)

O termo fermentação em estado sólido, ou fermentação semi-sólida, ou ainda fermentação em meio semi-sólido aplica-se ao processo de crescimento de micro-organismos sobre substratos sólidos sem a presença de água livre. A água presente nesses sistemas encontra-se ligada à fase sólida, formando uma fina camada na superfície das partículas (RAIMBAULT et. al.,1998).

1.5.2 Fermentação Submersa (FS)

Quando comparado com o método de cultivo em estado sólido, a fermentação submersa apresenta as vantagens de possuir mais fácil controle, necessita menos mão de obra para operação, melhor controle do processo, a superfície celular do agente fica inteiramente exposta ao meio, facilitando as trocas (absorção e excreção), a esterilização de um meio líquido é mais fácil, pode ser transformado em cultivo contínuo. A finalidade da agitação em cultivos submersos é a de suprir oxigênio e colocá-lo em contato com as células em crescimento, além de facilitar as trocas metabólicas entre as células e o meio (REGULY, 2000).

CAPÍTULO 2: USO DE ESCALA DE MCFARLAND ASSOCIADA À ESPECTROMETRIA UV-Vis PARA CONTAGEM DE CÉLULAS DE YARROWIA LIPOLYTICA QU69

Resumo

Com o crescente uso da biotecnologia para obtenção de produtos com valor econômico e a busca em diminuir o impacto ambiental causado por descarte de resíduos de maneira inadequada, cresceram também as pesquisas sobre micro-organismos capazes de sintetizar diversas fontes de carbono. A levedura *Yarrowia lipolytica* além de se destacar pela capacidade de crescer em ambientes hidrofóbicos, tem sido utilizada em processos de bioconversão para produção de diversos produtos de interesse industrial. O presente trabalho teve por objetivo aperfeiçoar os métodos de contagem de células da levedura *Yarrowia lipolytica* QU69, para utilização em bioprocessos. Foi utilizada a escala de McFarland associada à espectrofotometria UV-vis para estimar o número de células presentes em suspensões. O método testado se mostrou bastante confiável e reprodutível, podendo ser aplicado em análise rotina e experimentos de aulas. Além disso, o método estudado pode ser executado em menor tempo quando comparado com técnicas de contagem de colônias ou a comparação visual com a escala padrão que é subjetiva.

Palavras-chave: Câmara de Neubauer. Turbidimetria. Bioconversão. Absorbância

Abstract

New researches on microorganisms capable of synthesizing different carbon sources have been made to fulfill the growing use of biotechnology to obtain products with economic value and the search for reducing the environmental impact caused by inadequate waste disposal. The yeast *Yarrowia lipolytica* has stood out for its ability to grow in hydrophobic environments and it has been used in bioconversion processes to produce various products of industrial interest. McFarland standards and Neubauer chamber are the two most common methodologies employed to count viable cells, but they were originally made to count bacterial cells and blood cells and, furthermore, those methodologies can be quite subjective. In order to optimize yeast cell count for use in bioprocesses, McFarland standard associated with spectrophotometry were used to estimate the amount of the strain *Yarrowia lipolytica* QU69 cells present in a suspension. It proved to be a reliable, accurate and reproducible method, and it could be applied in routine analyzes and classroom experiments.

Keywords: Neubauer hemocytometer, turbidity, bioconversion, absorbance

1 INTRODUÇÃO

O uso da biotecnologia tem se apresentado como alternativa promissora para aproveitamento de resíduos e a obtenção de produtos de interesse industrial com baixo custo (PAGANINI et al., 2005). Diversas espécies de micro-organismos tem sido estudadas com o objetivo de serem utilizadas em processos considerados verdes e dentre as leveduras se destaca a *Yarrowia lipolytica*, uma levedura não convencional e com potencial em aplicações biotecnológicas (MADZAK, 2015).

É utilizada em processos de bioconversão para obtenção de ácido cítrico (SILVA et al., 2010), lipases (CARVALHO et al., 2017) proteínas unicelulares (MACHADO et al., 2015), entre outros. Além disso, tem a capacidade de assimilar diversas fontes de carbono, incluindo substratos hidrofóbicos (LIMA et al., 2013) e com isso seu uso se apresenta como rota alternativa para diminuir o impacto ambiental do descarte inadequado de resíduos, diminuindo possíveis problemas ambientais, bem como, agregar valor à matérias-primas por meio da produção de substâncias de interesse econômico.

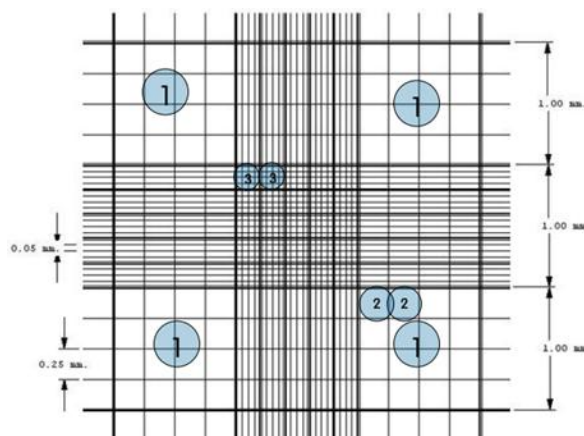
Para que o processo de bioconversão seja eficiente se faz necessário o controle de todas as etapas e um ponto importante a ser observado é o preparo do inóculo que será utilizado (VENDRUSCOLO et al., 2008). Dentre os métodos mais frequentemente utilizados para estimar o número de células presentes em determinada quantidade de suspensão, se destaca a escala de McFarland (MCFARLAND, 1907) e a Câmara de Neubauer (OLIVEIRA et al., 2003).

Uma das primeiras utilizações dos padrões de turvação de McFarland foi para estimar a população bacteriana em vacinas (MCFARLAND, 1907). A escala nefelométrica de McFarland consiste em uma série de 11 tubos numerados de 0,5 até 10, sendo que quanto maior o número dessa escala, maior a turbidez do meio e maior é o número de micro-organismos estimados na suspensão. O número de células de uma suspensão bacteriana pode ser determinado em aproximação, por comparação com os padrões da escala de McFarland, desta forma, o método consiste em comparar a olho nu os tubos padrão com o tubo de cultura bacteriana que se deseja estimar a contagem. Apesar da praticidade a principal desvantagem da utilização da escala é a subjetividade envolvida na interpretação da turbidez.

Outro método utilizado para estimar o número de células em suspensão em determinado meio é a câmara de Neubauer que determina o número de células em um volume específico de uma suspensão. É um dispositivo utilizado ao microscópio que possui gravação de linhas divididas em quadrantes de dimensões conhecidas (Figura 1). Neste dispositivo há a

padronização destes quadrantes, portanto, é possível visualizar a amostra ao microscópio e assim realizar a contagem determinando o número de células presentes em determinada área.

Figura 1 - Câmara de Neubauer e destaque para seus três diferentes quadrantes de contagem.



Os métodos descritos têm sido relatados em diversas publicações onde são em sua maioria aplicados para contagens de células bacterianas e sanguíneas, no entanto, não foram encontrados trabalhos relatando o uso dos métodos associados a espectrometria com aplicação para leveduras.

Diante do crescente interesse em bioprocessos, assim como, em aperfeiçoar o procedimento de preparo do inóculo utilizando a levedura *Yarrowia lipolytica* QU69, este trabalho teve por objetivo otimizar a utilização da escala de McFarland associada à espectrofotometria para estimar o número de células presentes em suspensões.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Métodos gerais

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A. e utilizados sem purificação prévia. A cepa de *Yarrowia lipolytica* QU69, foi gentilmente cedida pela Professora Patrícia Valente (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UFRGS – Brasil –RS). A contagem de células foi realizada previamente em câmara de Neubauer, Modelo Kasvi, Ref. OG200 com microscópio óptico modelo Olympus CX21FS1. O espectro de absorção máxima da levedura foi determinado utilizando um espectrofotômetro de microplacas Modelo Thermo Multiskan GO. A montagem da escala de McFarland foi realizada em Capela de exaustão e a manipulação da levedura realizada em capela de fluxo laminar modelo BioSeg modelo Bioseg 12 Classe II tipo A1.

2.2 Preparo da Escala padrão de McFarland

Primeiramente foram preparadas soluções aquosas de cloreto de bário a 1% e de ácido sulfúrico a 1%. Para o preparo da escala foram numerados sequencialmente 11 tubos de ensaio de mesmo tamanho e adicionada solução de cloreto de bário a 1% e solução de ácido sulfúrico a 1% de acordo com a Tabela 1. A escala preparada está demonstrada na Figura 2.

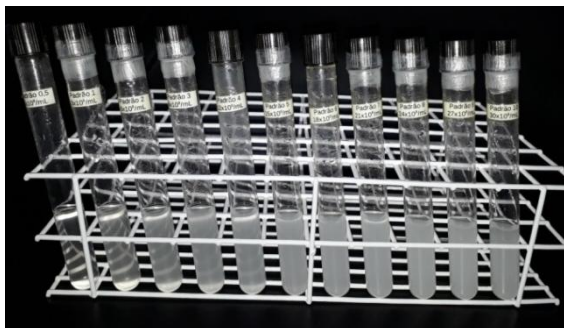
O cloreto de bário, por ser insolúvel, forma um precipitado que fica depositado no fundo dos tubos e quando estes são agitados, apresentam turvações diferentes que correspondem às suspensões bacterianas. A relação entre o grau de turvação e o número de bactérias estimado no meio é descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Relação entre a turbidez dos tubos e a concentração estimada de bactérias de acordo com McFarland.

Tubo^a	BaCl₂ 1% V (mL)	H₂SO₄ 1% V (mL)	Concentração de bactérias (x10⁸ UFC/mL)
0,5	0,05	9,95	1,5
1	0,1	9,9	3
2	0,2	9,8	6
3	0,3	9,7	9
4	0,4	9,6	12
5	0,5	9,5	15
6	0,6	9,4	18
7	0,7	9,3	21
8	0,8	9,2	24
9	0,9	9,1	27
10	1,0	9,0	30

^aVolume Final (10 mL).

Figura 2 - Escala padrão de McFarland.



2.3 Preparo do inóculo e contagem das células

As células da levedura *Yarrowia lipolytica* QU69 foram isoladas em meio GYP (PEREIRA-DIAS et al., 2000) e incubadas a 28°C / 48h. Após o período de incubação, com auxílio de uma alça de platina algumas células foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10mL de solução salina estéril até que fosse atingida turvação semelhante aos tubos padrão da escala de McFarland.

A contagem das células presentes nos tubos padronizados visualmente foi realizada em câmara de Neubauer utilizando microscópio óptico. A amostra foi introduzida no espaço entre a lâmina e a câmara espelhada com o auxílio de micropipeta, preenchendo completamente o espaço por capilaridade. A contagem foi realizada nos quadrantes maiores localizados nas laterais da câmara (Quadrante 1, Figura 1). Cada quadrante possui área de 1mm² e profundidade de 0,1mm. O número de células utilizado no cálculo foi a média aritmética da contagem entre os quatro quadrantes.

Como critérios para padronizar a contagem das células, foram contadas células com núcleo visível, assim como aglomerados de células onde o núcleo fosse facilmente distinguível como células isoladas. No caso de aglomerados cujas células fossem difíceis de ser distinguidas umas das outras, seriam contadas como uma única célula. Além disso, em casos em que as células dividiam dois quadrantes foram contadas as das paredes esquerda e inferior (contagem em “L”) e as que tocavam as paredes direita e superior foram desconsideradas. As contagens foram realizadas em até 30 minutos após a padronização dos tubos.

Para o cálculo da concentração de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por mL da suspensão foram considerados o número de células contadas, o fator de conversão para mL (1000), a superfície contada e a profundidade da câmara, conforme a equação abaixo:

$$\text{Concentração de células} = \frac{\text{número de células contadas} * \text{fator de conversão para mL}}{\text{superfície contada} * \text{profundidade da câmara}}$$

Após a contagem das células foi realizada a leitura da absorbância das suspensões padronizadas visualmente e dos padrões da escala de McFarland utilizando equipamento leitor de microplacas. Considerando que as amostras a serem lidas eram suspensões em que o precipitado sedimenta facilmente, foi padronizado que antes da leitura seria realizada agitação da placa por trinta segundos para que não houvesse sedimentação e possível alteração dos resultados.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A turbidimetria é o método mais comum para determinação do crescimento celular e com o advento de instrumentos analíticos mais robustos, confiáveis e precisos, as análises se tornaram cada vez mais rotineiras em laboratórios. Esse método é baseado na dispersão da luz ao passar por uma amostra que absorve ou dispersa a luz que passa através dela, esse mesmo efeito pode ser observado visualmente fazendo com que uma cultura pareça turva à observação visual. A absorção de luz está intimamente ligada ao tamanho e concentração celular. A cultura a ser avaliada, porém, deve ter densidade capaz de registrar alguma turvação no instrumento, e pode não ser possível a medida de culturas intensamente coradas ou que contenham outros materiais em suspensão, além das células.

Para que o método se torne eficiente, é necessário conhecer a relação existente entre a turbidez e a concentração celular. Isso pode ser obtido através de uma curva padrão ou curva de calibração, construída utilizando como parâmetro um método direto de medida de concentração de células. Em geral, associa-se a turbidez ao peso seco de células. Essa curva segue a lei de Lambert-Beer.

Após a determinação da absorção máxima (500nm), fez-se a leitura da absorbância dos tubos de ensaio da escala de McFarland (Figura 2) nas mesmas condições, o qual está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2 - Absorbância (500nm) obtida para cada tubo na escala de McFarland.

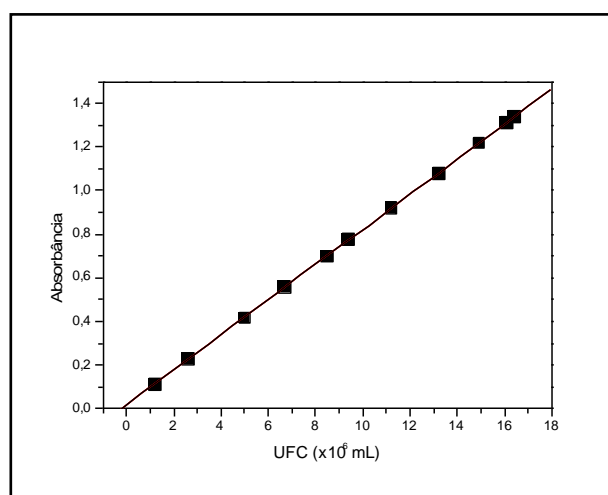
Tubo	BaCl₂ 1% V (mL)	H₂SO₄ 1% V (mL)	Absorbância (500nm)
0,5	0,05	9,95	0,104
1	0,1	9,9	0,159
2	0,2	9,8	0,242
3	0,3	9,7	0,375
4	0,4	9,6	0,401
5	0,5	9,5	0,499
6	0,6	9,4	0,580
7	0,7	9,3	0,661
8	0,8	9,2	0,742
9	0,9	9,1	0,823
10	1,0	9,0	0,904

Depois de realizadas as leituras e contagens foi possível relacionar o número de células contadas na câmara de Neubauer com a absorbância das suspensões e com isso construir o gráfico da Figura 3, a partir dos dados da Tabela 3.

Tabela 3 - Absorbâncias (500nm) para a contagem de células de *Yarrowia lipolytica* QU69, realizadas em câmara de Neubauer.

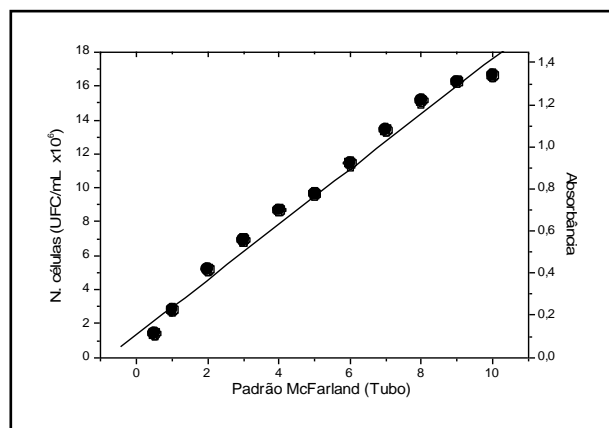
Amostra	N. Células ($\times 10^6$)	Absorbância (500 nm)
1	1,2	0,114
2	2,6	0,227
3	5,0	0,418
4	6,7	0,558
5	8,5	0,699
6	9,4	0,778
7	11,2	0,923
8	13,2	1,080
9	14,9	1,220
10	16,1	1,314
11	16,4	1,340

Figura 3 - Gráfico da absorbância x número de células de leveduras.



Relacionando os valores de absorbância determinados na escala de McFarland com o número de células determinado na Figura 3, podemos construir o gráfico a seguir, Figura 4.

Figura 4 - Resultados da contagem das células de *Yarrowia lipolytica* QU69 relacionado com a absorbância das suspensões padronizadas visualmente de acordo com McFarland.



Na Figura 4 pode ser verificado que a contagem das células alcançou padrão de 10^6 UFC/mL, diferente do estabelecido na escala padrão de McFarland que corresponde a 10^8 UFC/mL. Esse valor é justificado em função de que as células de leveduras possuem em geral tamanho de 20 a 50µm, já as células de bactérias podem variar entre 1 e 10µm (VACCARI et al., 2017), conseqüentemente é necessário número menor de células de leveduras para obter a turvação do meio semelhante ao da escala padrão.

4 CONCLUSÃO

A metodologia testada apresenta vantagens devido à sua velocidade, simplicidade e maior exatidão em comparação com a técnica de contagem de colônias ou a comparação visual.

É possível utilizar a leitura da absorbância para estimar o número de células da levedura *Y. lipolytica* QU69 presentes em suspensões que serão utilizadas em bioprocessos. Assim a estimativa das células se torna mais precisa, otimizando o tempo despendido para realizar a contagem em câmaras de Neubauer e diminuindo o erro que ocorre quando é realizada apenas a comparação visual com a escala padrão de McFarland.

5 REFERÊNCIAS

CARVALHO, T. et al. Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification. *Process Biochemistry*, v. 53, p. 259–266, 2017.

LIMA, J. R. C. et al. Utilization of crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* IMUFRJ 50678 in bioproduct production. *Journal Of Chemistry And Chemical Engineering*, Rio de Janeiro, v. 7, p.1087-1093, **2013**.

MACHADO J., F. R. S. et al. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. *International Food Research Journal*, v. 22, p. 1253-1260, **2015**.

MADZAK, C. *Yarrowia lipolytica*: recent achievements in heterologous protein expression and pathway engineering. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 99, n. 11, p.4559-4577, 7 maio **2015**. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-6624-z>.

MCFARLAND, J. The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. In: Campbell, H.D. et al. (Eds.). *Journal of the American Medical Association*, 14: 1176-1178, **1907**.

OLIVEIRA, R. A.G. et al. The absolute recommendation of chamber Neubauer method for platelets counting instead of indirect methods in severe thrombocytopenic patients. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. Rio de Janeiro, p. 139-141. abr. **2003**.

PAGANINI, C. et al. Aproveitamento de bagaço de maçã para produção de álcool e obtenção de fibras alimentares. *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras, v. 29, n. 6, p.1231-1238, **2005**. Bimestral.

PEREIRA-DIAS, S et al. Characterisation of yeast flora isolated from an artisanal Portuguese ewes' cheese. *International Journal Of Food Microbiology*, [s.l.], v. 60, n. 1, p.55-63, set. **2000**. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(00\)00323-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(00)00323-8).

SILVA, L.V. et al. Potential application of raw glycerol from biodiesel in citric acid production by *Yarrowia lipolytica*. *Chemical Engineering Transactions*, v. 20, p. 211-216, **2010**.

VACCARI, L. et al. Films of bacteria at interfaces. *Advances In Colloid And Interface Science*, [s.l.], v. 247, p.561-572, set. **2017**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2017.07.016>.

VENDRUSCOLO, F. et al. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dieta para alevinos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, p.487-493, nov. **2008**.

CAPÍTULO 2: BIOCONVERSÃO DE RESÍDUOS AGROINDUSTRIAIS POR *YARROWIA LIPOLYTICA* QU69: ANÁLISE DA PRODUÇÃO PROTEICA, LIPÍDICA E OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO

Resumo

Com o desenvolvimento da biotecnologia e com a busca por processos em que seja possível agregar valor comercial a produtos até então descartados, surge a possibilidade da utilização de resíduos agroindustriais em processos de bioconversão. Estes processos possuem como vantagens o baixo custo, fácil controle e a não utilização de produtos químicos. O objetivo do trabalho foi utilizar a levedura *Yarrowia lipolytica* QU69 para processos de bioconversão. Para o processo de bioconversão foi utilizada a levedura *Yarrowia lipolytica* QU69, a qual é amplamente utilizada para produção de lipídios, enzimas, ácido cítrico, proteínas, entre outros. O estudo realizado buscou avaliar a habilidade da levedura em utilizar como fonte de carbono resíduos agroindustriais sem que fosse realizada suplementação com glicose e/ou fontes de carboidratos para o desenvolvimento das células. O estudo avaliou a produção de proteínas e lipídios com diversas fontes de carbono e buscou a otimização do processo alcançando valores expressivos quando utilizado resíduo de casca de mandioca como fonte de carbono, meio de suplementação contendo uréia e processo conduzido sob agitação a temperatura de 40°C.

Palavras-chave: Leveduras. Biotransformação. Cascas de mandioca. Proteínas heterólogas. Biotecnologia. Reaproveitamento

Abstract

The development of biotechnology and the search for processes in which it is possible to add commercial value to previously discarded products, the possibility arises of the use of agroindustrial residues in bioconversion processes. These processes have the advantages of low cost, easy control and non-use of chemicals. The yeast *Yarrowia lipolytica* QU69 was used for the bioconversion process, which is widely used for the production of lipids, enzymes, citric acid, proteins, among others. The objective of this study was to evaluate the ability of yeast to use agroindustrial residues as a carbon source without supplementation with glucose and/or another carbohydrate sources for the development of the cells. The study evaluated the production of proteins and lipids with several carbon sources and sought the optimization of the process reaching expressive values when use manioc residues as a carbon source, urea containing supplementation medium and a process conducted under dubnoff stirring at 40°C.

Key words: Yeasts. Biotransformation. Manioc peels. Heterologous proteins. Biotechnology. Reaproveitamento

1 INTRODUÇÃO

Com o progresso do desenvolvimento industrial e com a busca constante por processos verdes, surge a necessidade de aperfeiçoar as vias existentes e de propor alternativas para a produção de compostos de interesse industrial utilizando processos de baixo custo e que não agredam o meio ambiente. A biotecnologia tem se mostrado rota alternativa e promissora para a produção de produtos com valor agregado por meio de processos de bioconversão, os quais aumentam a biodisponibilidade de compostos com o uso de micro-organismos reconhecidamente seguros como é o caso da levedura *Yarrowia lipolytica*.

A levedura *Yarrowia lipolytica* é classificada como GRAS (Generally Recognized as Safe) pela *Food and Drug Administration* (FDA), é aeróbia estrita e considerada uma das leveduras não convencionais com maior potencial em aplicações biotecnológicas (LIU; JI; HUANG, 2015). É capaz de assimilar hidrocarbonetos e compostos de petróleo (CSUTAK et al., 2015); glicose, manitol, acetato, piruvato, citrato, lactato (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW, 2014); e diversos substratos hidrofóbicos (ZHU; JACKSON, 2015), (MADZAK; GAILLARDIN; BECKERICH, 2004). Além disso, pode ser encontrada e isolada em diversos meios, entre eles, locais contaminados com óleos, plantas (LEDESMA-AMARO et al., 2016); variedades de queijos brie, feta e cheddar e produtos avícolas (ZINJARDE, 2014); solo e água do mar (SUTHERLAND; CORNELISON; CROW, 2014), entre outros.

Esta levedura é utilizada em diversos processos e sua biomassa já foi analisada e testada em diversas áreas. Sutherland, Cornelison e Crow (2014) testaram a levedura para produção de proteínas unicelulares, aromas, bioemulsificantes, lipases e ácido cítrico. Foi utilizada para produção de proteínas unicelulares e ácidos graxos (HAMZA et al., 2017), ácido cítrico (MACHADO et al., 2015), biorremediação e tratamento de efluentes petróleo (CSUTAK et al., 2015), proteases, lipases, ácidos orgânicos (BANKAR; KUMAR; ZINJARDE, 2009) e diversas outras substâncias de acordo com a variação da fonte de carbono e do meio de suplementação utilizados (LIU; JI; HUANG, 2015).

Dados publicados pela FAO (2007) apontam que do total de frutas processadas para produção de sucos e polpas cerca de 40% são resíduos agroindustriais. Além disso, nos últimos anos a capacidade de processamento das agroindústrias vem aumentando e com isso a quantidade de resíduos gerada e também os custos operacionais. Em virtude disso, a biotransformação possui vantagens como baixo custo de processo, facilidade da aplicação de micro-organismos, melhora da digestibilidade, tem fácil controle além de não utilizar

produtos químicos. Sendo assim, buscou-se a utilização de diversos resíduos agroindustriais como fonte de carbono para a produção de biomassa com compostos de interesse industrial.

Diversos estudos utilizam a levedura *Y. lipolytica*, porém no que se refere ao meio de suplementação utilizado para o desenvolvimento das células e produção da biomassa alguns experimentos realizam a suplementação do meio mineral com glicose e com isso alcançam resultados significativos quanto a reprodução celular e consequente bioconversão. Frente ao exposto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a habilidade da levedura em assimilar fontes de carbono com matrizes complexas utilizando resíduos agroindustriais como fonte de glicose.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Equipamentos e Reagentes

Todos os reagentes e solventes utilizados foram de grau P.A. e utilizados sem purificação prévia. A cepa de *Yarrowia lipolytica* QU69, foi gentilmente cedida pela professora Patrícia Valente (Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia – UFRGS – Brasil –RS) e encontra-se depositada na coleção de culturas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob a identificação UFMG-CM-Y336. As análises foram realizadas em triplicata e o resultado apresentado é a média aritmética entre os valores obtidos, juntamente com seu intervalo de confiança (IC) a 95%.

2.2 Preparo do inóculo e fermentação

Para realizar o preparo do inóculo contendo as células da levedura, primeiramente foi preparado ágar GYP conforme descrito por Csutak et. al (2015) contendo glicose 2%, peptona 1%, extrato de levedura 0,5% e ágar 2%; a levedura foi isolada por esgotamento e incubada a 28°C por 48 horas (estufa Ethik Technology, 4410-5NDRE). Após o período de incubação, algumas colônias foram transferidas para tubos de ensaio contendo 10mL de solução salina e então realizada leitura da densidade óptica a 500nm a fim de se obter absorbância de 0,104, que conforme estudo prévio corresponde ao tubo 0,5 da escala padrão de McFarland e 2×10^6 UFC/mL de células de *Y. lipolytica* QU69.

Foi utilizado meio de suplementação mineral descrito por Santos et al. (2013) com modificações, composto de 1% de nitrato de sódio (NaNO_3), 0,1% de fosfato de potássio

monobásico (KH_2PO_4) e 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$). As fermentações foram realizadas em banho com agitação tipo Dubnoff (Nova Instruments NI 1232) durante nove dias com temperatura de 30°C. Foram utilizados frascos erlenmeyer com capacidade de 125mL, contendo 5% de resíduo como fonte de carbono e 50mL do meio de suplementação, os frascos contendo o resíduo e o meio mineral foram autoclavados, adicionados de 1mL da suspensão de células contendo 2×10^6 UFC/mL e incubados em banho com agitação de 100rpm em temperaturas e tempos pré-determinados.

2.3 Escolha e preparo dos resíduos

Nos experimentos foram utilizados resíduos agroindustriais coletados em propriedades rurais próximas ao *campus* da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS), *campus* Laranjeiras do Sul - PR. Os resíduos foram previamente secos a 50°C por 24 horas, triturados em moinho de rotor martelo (Fortinox STAR FT53) e peneirados em peneiras de 6-8 mesh, estocados em frascos de vidro com tampa em temperatura ambiente. Foram processados resíduos de bagaço de laranja, cascas de abóbora, banana, batata, batata doce, laranja, mandioca, maracujá, cascas e sementes de melão, caroços de abacate, caroços de algodão, sementes de aveia, sementes de milho e cascas e sementes de trigo.

2.4 Métodos analíticos

Após o processo de bioconversão a biomassa obtida foi congelada e submetida ao processo de liofilização (Liotop L101). Foram realizadas análises de proteínas e lipídios totais e análise cromatográfica dos ácidos graxos tanto no resíduo *in natura* quanto na biomassa liofilizada.

2.4.1 Determinação de proteínas totais (Kjeldahl)

Para determinação do teor (%) de proteínas totais foi utilizada metodologia descrita por Kjeldahl, conforme procedimento AOAC (1990) com modificações. Esta análise quantifica o nitrogênio presente na amostra que é posteriormente convertido em proteínas através de um fator de correção, neste caso, 6,25 que corresponde a alimentos em geral.

Foram utilizados 0,5g da amostra que foi digerida com ácido sulfúrico (H_2SO_4) durante aproximadamente seis horas, após a digestão as amostras foram destiladas em

destilador de nitrogênio (Tecnal TE-0363) e o destilado recolhido em erlenmeyer contendo 25mL de solução de ácido bórico 4%. A última etapa da análise consistiu em titular o destilado com solução de ácido clorídrico 0,1 mol/L.

2.4.2 Determinação de lipídios (Bligh-Dyer)

A análise do teor (%) de lipídios totais foi realizada através da metodologia descrita por Bligh-Dyer (1959) com modificações. Esta metodologia pode ser utilizada em alimentos secos ou que possuam alto teor de gordura e devido ao uso de solventes apolares, ocorre à extração de todas as classes de lipídios.

Para a análise foram utilizados 2,0g de amostra que foi adicionada de clorofórmio e álcool metílico e submetida a agitação durante trinta e cinco minutos em agitador magnético, após esse período foi adicionada solução de sulfato de sódio 1,5% para que ocorresse a separação das fases. Foram coletados 15mL da fase inferior que foi adicionada em tubo de ensaio onde foi adicionado 1g de sulfato de sódio anidro para retirar os possíveis traços de água que poderiam estar presentes na amostra. Na última etapa foram coletados 5mL da solução do tubo de ensaio e colocados em béquer previamente seco e tarado, o solvente presente na amostra foi evaporado em temperatura ambiente e posteriormente o béquer foi pesado para se calcular o teor de lipídios da amostra através da diferença da massa do béquer.

2.4.3 Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

Para a análise de ácidos graxos por cromatografia, as amostras de lipídios foram submetidas ao processo de transesterificação e transformadas em ésteres metílicos conforme procedimento descrito na IUPAC (1987) e utilizado por Aued-Pimentel et al. (2005). Foram adicionados n-hexano e solução de KOH em metanol ao resíduo lipídico obtido na análise de Bligh-Dyer, realizada agitação e adicionada solução saturada de cloreto de sódio para separar as fases, coletada a fase orgânica e realizada diluição de 12,5 vezes com n-hexano para então realizar a injeção no cromatógrafo.

A análise cromatográfica do perfil de ácidos graxos foi realizada em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GCMS-QP2010 Ultra acoplado a espectrômetro de massa GC-2010Plus. Foi utilizada coluna capilar de sílica fundida NST 5ms de 30m com diâmetro interno de 0,25mm e espessura do filme de 0,25µm. As condições de operação foram: temperatura programada da coluna: 110°C (2 min), taxa de aquecimento 10°C/min até 200°C

(10 min), 5°C/min até 230°C (20 min); temperatura do injetor 250°C; temperatura do detector 200°C; velocidade linear do gás de arraste (hélio) 40 cm/s. A corrida com detector de massa foi realizada no modo “scan”, percorrendo massas de 35 a 500 m/z, energia de ionização de 70eV por impacto de elétrons.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados quanto a área de pico e identificados por similaridade utilizando como referência as bibliotecas NIST08, NIST08s e NIST11.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Produção de proteínas

Inicialmente foram realizados processos utilizando meio de suplementação padrão 1% de nitrato de sódio, 0,1% de fosfato de potássio monobásico e 0,05% de sulfato de magnésio heptahidratado com agitação de 100rpm a 30°C, durante nove dias. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados obtidos quanto ao teor proteico da fonte de carbono *in natura* e da biomassa liofilizada acompanhados da variação proteica após o processo de bioconversão.

Fonte de carbono	Proteínas na fonte de carbono* (%)	Proteínas na biomassa liofilizada*,** (%)	Variação Proteica (%)
Caroço de algodão	26,4 ± 1,7	22,2 ± 2,5	-16
Cascas de abóbora	11,4 ± 0,5	13,0 ± 3,7	14
Cascas de banana	5,4 ± 0,5	9,4 ± 1,2	74
Cascas de batata	14,1 ± 1,2	10,9 ± 1,2	-23
Cascas de batata doce	3,6 ± 0,6	15,9 ± 0,8	342
Cascas de laranja	6,8 ± 0,5	5,8 ± 1,8	-15
Cascas de mandioca	8,0 ± 0,8	22,3 ± 0,9	179
Cascas de maracujá	5,8 ± 0,4	2,3 ± 0,8	-60
Caule de bananeira	4,3 ± 0,6	5,3 ± 1,2	22
Sementes de aveia	13,6 ± 0,4	16,1 ± 1,2	18
Sementes de Milho	10,2 ± 0,4	26,8 ± 5,4	163
Sementes e cascas de trigo	18,7 ± 1,7	12,6 ± 0,8	-33

*Os resultados apresentados correspondem a média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

**Resultados apresentados com a subtração do valor de 6,6 correspondente a contribuição do nitrato de sódio no resultado obtido.

Os dados apresentados na Tabelas 1 mostram que algumas fontes de carbono como caroço de algodão, cascas de batata, cascas de laranja, cascas de maracujá e sementes e cascas de trigo obtiveram resultados negativos para a produção de proteínas, esses resultados

demonstram a dificuldade de difusão do meio mineral entre a fonte de carbono e as células da levedura, mesmo com agitação a difusão não foi suficiente. Essas fontes não são adequadas para bioconversão com *Y. lipolytica* QU69 nas condições testadas neste experimento.

Os resíduos de cascas de abóbora, cascas de banana, caule de bananeira e sementes de aveia são considerados adequados para utilização em processo de bioconversão, pois alcançaram valores que variaram entre 5,3% a 16,1%, considerados resultados intermediários, porém, diante de outras fontes de carbono testadas que obtiveram resultados superiores, optou-se em não dar seguimento ao estudo utilizando ganhos proteicos inferiores a 100%.

O resíduo de casca de batata doce obteve o maior ganho proteico, que foi de 342%, inicialmente o resíduo possuía 3,6% de proteínas e após nove dias de fermentação 15,9%. O expressivo aumento no teor de proteínas se deve ao teor de açúcares que compõe a raiz que conforme Leonel e Cereda (2002) podem chegar a 12,7%. Mattanna et al. (2014a) utilizaram meio contendo 10% de glicose e Gao et al. (2010) utilizaram 2% de glicose no meio de suplementação com o objetivo de estimular maior desenvolvimento das células. Como a fonte de carbono utilizada possuía naturalmente quantidade expressiva de açúcares, estes contribuíram para maior desenvolvimento celular e consequente maior produção de proteínas.

Nos processos onde foram utilizadas cascas de mandioca e sementes de milho como fontes de carbono os ganhos proteico foram de 179 e 163%, respectivamente, considerados os mais promissores em função do teor de proteínas após a bioconversão ter sido de 22,3% para cascas de mandioca e 26,8% para sementes de milho. Apesar dos resultados, o milho não é considerado um resíduo e é amplamente utilizado na alimentação humana e animal, assim, optou-se em dar seguimento ao estudo utilizando cascas de mandioca como fonte de carbono, pois esta é considerada um resíduo e atualmente ainda não possui destinação que agregue valor ao produto.

Yang et al. (1993) realizaram trabalho visando enriquecimento proteico de resíduos de batata doce utilizando micro-organismos diversos em fermentação em estado sólido e obtiveram aumento no teor proteico quando realizado processo com *Saccharomyces* e *Rhizopus*, os incrementos em teor proteico obtidos foram de 3,2 para 8,4 e 18,5%, respectivamente para cada micro-organismo.

Vandenberghe et al. (2000) utilizaram bagaço de mandioca como fonte de carbono para bioconversão com *A. niger* para produção de ácido cítrico e observaram que houve enriquecimento proteico, sendo o teor inicial de era de 13,1% e ao final de 120 horas de cultivo houve incremento para 23,1%.

Villas-Bôas e Esposito (2000) utilizaram *Candida utilis* e bagaço de maçã como fonte de carbono para fermentação semi-sólida e alcançaram aumento de 100% no teor de proteína bruta considerado pelos autores um ganho expressivo.

Vendruscolo et al. (2008), utilizaram bagaço de maçã como fonte de carbono para fermentação semi-sólida com *Gongronella butleri* CCT 4274 durante sete dias e obtiveram resultados de até 15,2% de proteínas solúveis utilizando nitrato de sódio como fonte de nitrogênio no meio suplementação.

3.2 Produção de lipídios microbianos

Um micro-organismo pode ser considerado oleaginoso quando acumula mais de 20% do total do seu peso seco em óleo microbiano (MATTANNA et al., 2014a). Amorim; Rosa e Valente realizaram estudos com seis cepas de *Y. lipolytica* e dentre elas a QU69 foi a quinta maior produtora com 22%, mostrando que existem outras cepas da espécie que possuem maior capacidade em acumular lipídios.

Poli et al. (2013) testaram diferentes metodologias afim de verificar qual o processo mais eficiente associado a metodologia de Bligh-Dyer para realizar a lise celular de *Y. lipolytica* QU21 e obter o óleo microbiano intracelular. Entre os métodos testados a utilização de pérolas de vidro com agitação e banho ultrassom com pérolas de vidro Os resultados obtidos foram superiores quando comparados somente a extração com solventes.

Em testes preliminares com a biomassa produzida pela levedura *Y. lipolytica* QU69 utilizando casca de banana como fonte de carbono foi verificado que a utilização de banho ultrassom, agitação com pérolas de vidro ou os dois métodos associados para romper as células apresentaram resultados inferiores, ($1,3\% \pm 0,3$, $1,9\% \pm 0,51$ e $2,0\% \pm 0,24$, respectivamente) quando comparados a extração com solventes ($5,4\% \pm 0,61$), sendo assim, para a quantificação de lipídios da biomassa não foi aplicado método para realizar a lise celular.

A biomassa produzida foi analisada quanto ao teor de lipídios e os resultados são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Resultados obtidos quanto ao teor lipídico da fonte de carbono *in natura* e da biomassa liofilizada acompanhados da variação lipídica após o processo de bioconversão.

Fonte de carbono	Lipídios na fonte de carbono* (%)	Lipídios na biomassa liofilizada* (%)	Variação lipídica (%)
Caroço de abacate	4,9 ± 1,1	4,3 ± 0,8	-12
Caroço de algodão	19,6 ± 1,5	8,8 ± 0,3	-55
Casca de banana	5,6 ± 0,7	5,4 ± 0,6	-4,28
Casca de batata	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,1	92
Casca de batata doce	2,5 ± 0,8	2,6 ± 0,6	1,57
Casca de laranja	4,0 ± 0,2	10,1 ± 0,9	158
Casca de mandioca	1,2 ± 0,4	9,4 ± 1,8	660
Casca de maracujá	1,6 ± 0,2	1,5 ± 0,0	-6
Caule de bananeira	2,6 ± 0,5	5,5 ± 0,5	110
Sementes de aveia	6,0 ± 0,3	8,4 ± 0,9	39
Sementes de milho	5,4 ± 1,6	4,2 ± 0,5	-22
Sementes e cascas de trigo	2,3 ± 0,3	2,1 ± 0,7	-8,70

*Os resultados apresentados correspondem a média aritmética ± o intervalo de confiança (IC) a 95%.

Analisando a Tabela 2 pode ser observado que fontes de carbono como caroço de algodão e abacate, casca de banana, casca de batata doce, casca de maracujá, sementes de milho e sementes e cascas de trigo, obtiveram resultados negativos quanto ao ganho lipídico indicando que não são fontes adequadas para bioconversão e produção de lipídios com *Y. lipolytica* QU69 nas condições aplicadas no experimento pois Poli et al. (2014) e Christophe et al. (2012) relatam que meios de suplementação onde é realizada a adição de nitrogênio favorecem a produção de proteínas, pois o nitrogênio estimula a reprodução celular enquanto que meios onde há deficiência de nitrogênio ocorre maior produção de lipídios, visto que a levedura produz óleo no intuito de proteger e manter suas células ativas no meio deficiente.

As fontes de carbono que obtiveram resultados positivos quanto à produção de lipídios foram cascas de batata, cascas de laranja e o caule de bananeira. Estas fontes podem ser consideradas meios em que a levedura possuiu dificuldades em se adaptar e como consequência produziu óleo na tentativa de proteger as células e mantê-las ativas.

A utilização das cascas de mandioca alcançou resultados positivos expressivos tanto para a produção de proteínas como para a produção de lipídios tendo se mostrado um excelente resíduo para uso em processos de bioconversão. Adicionalmente as cascas de mandioca apresentavam alta solubilidade no meio de suplementação o que contribuiu para maior difusão entre meio de suplementação, fonte de carbono e células da levedura. Outro fato a ser considerado é que o teor de cinzas presentes nestes resíduos que segundo Faria et al.

(2011) chega a 5%, os minerais presentes nos resíduos contribuem para maior suplementação de macro e micronutrientes e influenciam positivamente a atividade da levedura.

Análise do perfil dos ácidos graxos produzidos

Depois de realizada a quantificação dos lipídios produzidos, estes foram esterificados, segundo metodologia descrita previamente e analisados quanto ao perfil de ácidos graxos presente nas amostras.

Os ésteres metílicos de ácidos graxos foram quantificados quanto a área de pico e identificados por similaridade utilizando como referência as bibliotecas NIST08, NIST08s e NIST11. Foram considerados e listados apenas compostos com percentual de similaridade acima de 80%. Os resultados são apresentados na Tabela 3 onde estão descritos os ácidos graxos correspondentes aos ésteres metílicos identificados na análise e os resultados são expressos em porcentagem da área do pico em relação ao total de ésteres metílicos de ácidos graxos detectados na amostra. Os ácidos graxos com áreas de pico com percentual inferior a 10% não foram descritos e serão apresentados na Tabela 3 como “outros ácidos graxos”.

Entre os ácidos graxos descritos como “outros ácidos graxos” estão ácido paulínico (C20:1 n-7) com variação da área de pico entre 4,3 e 7,1%, ácido palmitoleico (C16:1 n-7 *cis*) com área de 1,5 a 6,7%, ácido cáprico (C10:0t) que foi detectado apenas no resíduo e na biomassa resultante da fermentação com cascas de batata doce em contração de 6,5 e 3,4%, respectivamente. Já o heneicosanoico (C21:0t) presente na biomassa resultante da fermentação com sementes de aveia com área de pico de 1,6% e ácido pentadecanoico (C15:0t) em concentrações que variaram de 1,1 a 9,2%.

Alguns ácidos graxos foram produzidos durante o processo de bioconversão, entre os quais os ácidos graxos de cadeia longa (entre 16 e 18 carbonos), foram encontrados em maior proporção o ácido palmítico (C16:0t) em concentrações que variaram de 3,6 a 74,4%, ácido heptadecanoico (C:17n-7t) encontrado apenas na biomassa resultante da bioconversão com cascas de banana em concentração de 13,9% , ácido elaídico (C18:1 n-9t) presente na maior parte das biomassas analisadas em concentrações que variaram de 11,1 até 47,2%, (apenas as biomassas produzidas com resíduos de caroço de abacate, cascas de banana e caule de bananeira não apresentaram este composto), ácido linoléico (C18:2 n-9,12*cis*) presente em todas as biomassas exceto no caule de bananeira em concentrações que variaram de 17,2 a 53,5%.

Resultados semelhantes quanto ao perfil de ácidos graxos foram relatados por Mattanna et al. (2014a) quando utilizaram 16 cepas de *Y. lipolytica* para produção de lipídios,

no entanto foi relatado maior ganho lipídico em fermentação realizada em três dias. O meio de suplementação e o tempo de fermentação também interferem na produção de lipídios, Mattanna et al. (2014a) testaram diferentes fontes de nitrogênio e tempos de fermentação, avaliaram a produção de lipídios por *Y. lipolytica* QU22 e QU137 e concluíram que fontes de nitrogênio orgânico foram mais eficientes para produção de biomassa e rendimento lipídico e que após três dias de fermentação não houve aumento significativo no teor de lipídios produzidos.

Analisando a Tabela 3, pode ser observado que alguns ácidos graxos estavam presentes na fonte de carbono e foram consumidos pela levedura durante o processo de bioconversão. Zhu, Zong e Wu (2008) e Kitcha e Cheirsilp (2011) relataram uma diminuição do conteúdo lipídico após um longo período de cultivo, sugerindo que micro-organismos oleaginosos utilizam lipídios acumulados na proliferação celular após uma diminuição da glicose disponível durante a fase estacionária.

Considerando que o processo realizado neste trabalho foi de nove dias, as células podem ter produzido maior quantidade e variedade de ácidos graxos porém estes foram consumidos em função do longo tempo de fermentação.

Ahmed et al. (2008) verificaram que o nível de oxigênio é um fator importante e influencia na composição do perfil de ácidos graxos dos micro-organismos oleaginosos, em altas ou baixas saturações de oxigênio podem ocorrer modificações quanto ao rendimento e composição lipídica.

Tabela 3 - Perfil dos ácidos graxos presentes na fonte de carbono in natura e na biomassa após a fermentação.

Fonte de carbono	Origem	Caroço de abacate	Caroço de algodão	Casca de banana	Casca de batata	Casca de batata doce	Casca de laranja	Casca de mandioca	Casca de maracujá	Caule de bananeira	Sementes de aveia	Sementes de milho	Sementes e cascas de trigo
Ácido Cinâmico trans	<i>in natura</i>	-	-	-	-	12,4	-	-	-	-	-	-	-
	Biomassa	-	-	-	-	9,2	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Láurico C12:0 t	<i>in natura</i>	-	-	-	-	28,1	-	-	-	-	-	-	-
	Biomassa	-	-	-	-	22,8	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Mirístico C14:0 t	<i>in natura</i>	-	0,8	-	-	-	-	-	-	1,8	-	-	-
	Biomassa	-	2,0	-	-	2,7	0,2	-	-	-	-	-	12,3
Ácido palmítico C16:0 t	<i>in natura</i>	-	3,6	-	-	15,6	55,9	44,1	61,2	74,4	40,2	14,8	24,2
	Biomassa	-	31,0	42,0	53,1	18,1	26,0	26,8	26,1	-	25,4	32,4	40,0
Ácido margárico C17:0 t	<i>in natura</i>	21,7	23,6	21,5	36,6	-	-	-	-	-	-	-	-
	Biomassa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Heptadecanóico C17:1 n-7t	<i>in natura</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Biomassa	-	-	13,87	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido	<i>in natura</i>	-	3,0	10,7	8,3	2,8	4,6	-	-	7,3	-	2,8	1,0

Estearico C18:0 t	Biomassa	5,3	-	2,6	5,5	2,6	-	1,9	-	-	1,2	-	3,1
Ácido Elaídico C18:1 n- 6t	<i>in natura</i>	27,5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Biomassa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ácido Vacênico C18:1 n- 7t	<i>in natura</i>	-	-	11,3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Biomassa	11,2	-	-	-	-	-	23,7	-	-	-	-	-
Ácido Elaídico C18:1 n- 9t	<i>in natura</i>	-	15,9	24,6	-	-	-	47,7	-	-	7,1	37,9	19,1
	Biomassa	-	23,0	-	11,8	13,8	43,7	12,4	47,0	-	43,2	47,2	11,1
Ácido Linoléico C18:2 n- 9-12c	<i>in natura</i>	44,3	53,0	36,5	40,8	29,1	35,6	7,3	-	13,3	4,6	44,6	54,6
	Biomassa	44,3	36,2	19,7	21,2	24,5	30,2	19,2	24,5	-	17,2	20,5	31,
Ácido Linoléico C18:3 - 9,12,15c	<i>in natura</i>	-	-	-	12,5	5,5	-	-	38,7	-	-	-	-
	Biomassa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Outros ácidos graxos	<i>in natura</i>	1,5	0,6	3,7	1,8	6,5	3,9	-	-	-	10,5	-	-
	Biomassa	-	6,1	-	8,4	3,4	2,4	13,4	2,5	-	10,8	-	1,5

Pode ser verificado na Tabela 2 que a biomassa proveniente da bioconversão utilizando caule de bananeira como fonte carbono obteve ganho de 110% quanto ao teor lipídico, porém quando analisado o perfil dos ácidos graxos presentes na amostra (Tabela 3) não foi detectado nenhum ácido graxo, indicando que quando realizada análise de lipídios foram extraídos compostos lipofílicos que possuem afinidade com o solvente mas que todavia não são ácidos graxos.

O óleo produzido por leveduras oleaginosas pode ser utilizado para produção de biodiesel. Poli et al. (2013) relatam que para o óleo ser considerado uma matéria-prima adequada para fabricação de biodiesel, a composição de ácidos graxos é um critério importante, a qual deve possuir alto conteúdo de ácidos graxos saturados e/ou monoinsaturados de cadeia longa. Considerando os resultados obtidos com *Y. lipolytica* QU69 devem ser consideradas novas análises com variações do meio, da agitação e da temperatura com o propósito de aumentar a quantidade de lipídios produzida, no entanto, no que diz respeito a diversidade produzida em ácidos graxos de cadeia longa estes podem ser considerados adequados para possível utilização em processos de fabricação de biodiesel.

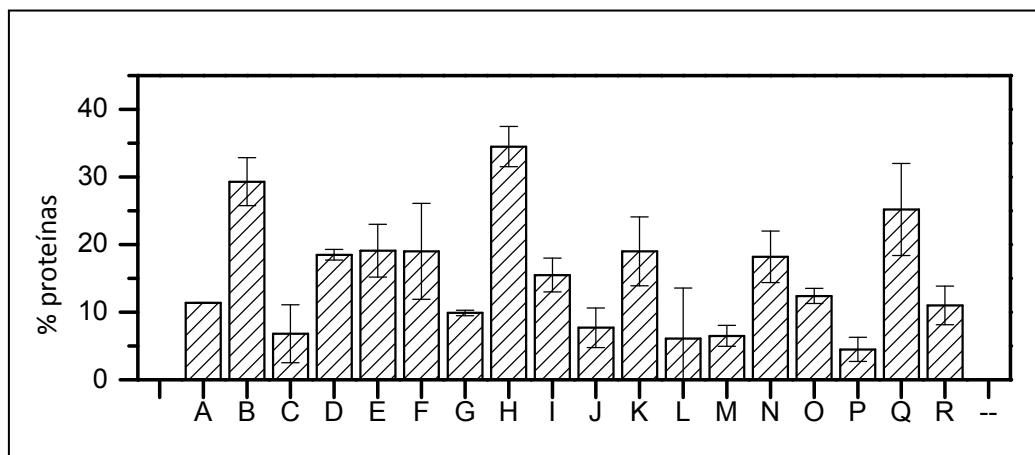
3.3 Otimização do processo de produção de proteínas

Analizando os resultados apresentados nas Tabelas 1 e 2, foi possível observar que o resíduo de casca de mandioca quando utilizado como fonte de carbono na bioconversão com *Y. lipolytica* QU69 apresentou resultados expressivos quanto ao aumento do teor proteico e lipídico que foram de 179% e 660% respectivamente, correspondendo ao teor final de 22,3% para proteínas e 9,4% para lipídios.

Buscando otimizar o processo de bioconversão para a produção de proteínas foram realizados testes com cascas de mandioca como fonte de carbono. Adicionalmente foi realizada a variação da fonte de nitrogênio (nitrato de sódio (NaNO_3), sulfato de amônio ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) e uréia ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$)); temperatura (20, 30 e 40 °C) e utilizando banho com e sem agitação. Por fim foi analisado qual o tempo necessário para que ocorresse o máximo de produção de proteínas.

Os resultados obtidos durante o processo de otimização da bioconversão são apresentados na Figura 1.

Figura 1 - Otimização do processo de produção de proteínas por *Y. lipolytica* QU69 em função da variação da fonte de nitrogênio, temperatura e agitação.



*Resultados apresentados com a subtração dos valores de 6,6 para nitrato de sódio, 19,0 para sulfato de amônio e 37,0 para uréia, correspondente a contribuição do nitrogênio adicionado ao meio de suplementação.

A – Nitrato de sódio 20°C com agitação, B – Uréia 20°C com agitação, C – Sulfato de amônio 20°C com agitação, D – Nitrato de sódio 30°C com agitação, E – Uréia 30°C com agitação, F – Sulfato de amônio 30°C com agitação, G – Nitrato de sódio 40°C com agitação, H – Uréia 40°C com agitação, I – Sulfato de amônio 40°C com agitação, J – Nitrato de sódio 20°C sem agitação, K – Uréia 20°C sem agitação, L – Sulfato de amônio 20°C sem agitação, M – Nitrato de sódio 30°C sem agitação, N – Uréia 30°C sem agitação, O – Sulfato de amônio 30°C sem agitação, P – Nitrato de sódio 40°C sem agitação, Q – Uréia 40°C sem agitação, R – Sulfato de amônio 40°C sem agitação.

Os resultados mostram que as fermentações que foram conduzidas em banho com agitação tipo dubnoff de 100rpm foram as que obtiveram maior incremento no teor de proteínas independente do meio de suplementação e da temperatura utilizados. As médias dos teores de proteína obtidas com agitação foram de 18,2%, enquanto que sem agitação a média alcançada foi de 12,3%. Resultados que eram esperados, pois a levedura *Y. lipolytica* é um micro-organismo estritamente aeróbio, logo, necessita da presença de oxigênio para se adaptar e desenvolver, neste caso a agitação realizada proporcionou maior incorporação de oxigênio ao meio e com isso melhor desenvolvimento e consequente reprodução das células.

No que se refere a contribuição da temperatura durante o processo de bioconversão, verifica-se que, a temperatura isoladamente não exerceu influência nos teores finais de proteínas, considerando que houve grande variação dos resultados obtidos mesmo quando comparada individualmente cada temperatura. A variação dos resultados parece ocorrer mais em função da variação da agitação e da fonte de nitrogênio do que em relação à temperatura aplicada.

As fermentações onde foi utilizada uréia como fonte de nitrogênio obtiveram maiores resultados independente da temperatura e agitação aplicadas. Todos os teores finais ficaram

acima de 19% de proteínas. Nos processos onde foi utilizado nitrato de sódio como fonte de nitrogênio foram encontrados os menores resultados seguidos do sulfato de amônio.

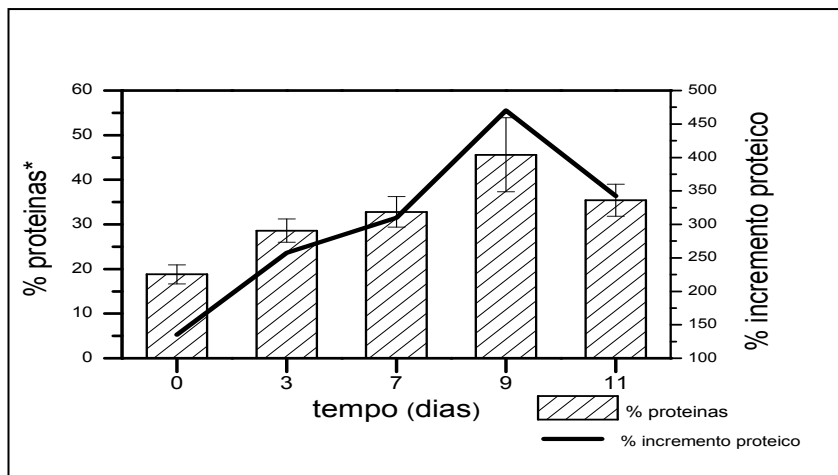
Gao e Shi (2013) e Mattanna et al. (2014b), indicam que leveduras possuem maior facilidade em assimilar fontes orgânicas de nitrogênio. Por se tratar de fonte de nitrogênio de origem orgânica a uréia obteve maior facilidade em ser utilizada como substrato para crescimento das células de *Y. lipolytica* QU69 e sendo o sulfato de amônio e o nitrato de sódio fontes inorgânicas o micro-organismo enfrentou dificuldades em assimilá-los o que resultou em menor produção de proteínas.

Quando realizada análise de todo o processo, pode-se observar maiores ganhos relativos ao teor de proteínas quando utilizada agitação de 100rpm, uréia como fonte de nitrogênio e temperatura de 40°C alcançando valores de 34,5% \pm 3 e incremento de 331% em relação ao teor inicial de proteínas do resíduo sendo esta a condição ideal dentre as testadas para maior produção de proteínas.

Vendruscolo et al. (2008) utilizaram bagaço de maçã como fonte de carbono e *Gongronella butleri* CCT 4274 como bioconversor, obtiveram ganhos menores quando utilizado sulfato de amônio, seguido pelo nitrato de sódio e a maior concentração de proteínas foi quando utilizada uréia como fonte de nitrogênio. Os autores alcançaram valores finais de 19,63%, que corresponde a um incremento de 230% em relação ao teor (%) inicial.

Obtidas as melhores condições referentes a temperatura, agitação e fonte de nitrogênio foi realizado estudo para verificar qual seria o tempo necessário para se atingir o pico de produção de proteínas. Foi iniciada nova fermentação utilizando uréia como fonte de nitrogênio, em temperatura de 40°C e com agitação de 100rpm. Amostras foram coletadas a cada 24 horas durante 11 dias, congeladas e liofilizadas para quantificação do nitrogênio e posterior conversão em proteínas. Na Figura 2 é apresentado o perfil da produção de proteínas ao longo dos dias.

Figura 2 - Perfil da produção de proteínas por *Y. lipolytica* QU69 ao longo de 11 dias acompanhado do incremento proteico.



*Resultados apresentados com a subtração do valor 37,0 para uréia, correspondente a contribuição do nitrogênio adicionado ao meio de suplementação.

No início do processo houve uma pequena estabilidade na produção durante os tempos zero e um onde o acréscimo proteico foi em torno de 110%, resultado esperado considerando que micro-organismos necessitam de um tempo de adaptação ao meio em que são inoculados.

A partir do terceiro dia do experimento, houve acréscimo considerável no teor proteico que chegou a 255%. Considerando a aplicação do processo de bioconversão em escala industrial, o processo poderia ser interrompido logo no terceiro dia visto que neste dia a produção foi de $28,2\% \pm 3,7$ e considerando os custos energéticos e de equipamentos, conduzir o processo durante maior tempo poderia se tornar economicamente inviável.

Após sete dias a produção foi de $32,8\% \pm 3,4$, correspondendo ao aumento proteico de 310%.

A amostra coletada no nono dia possuiu o maior teor de proteínas, que foi de $45,6\% \pm 8,3$ que corresponde ao incremento de 470% em relação à proteína inicial da fonte de carbono que era de $8\% \pm 0,84$, com isso este tempo do experimento foi considerado o momento em que houve o pico de produção de proteínas. Após o tempo nove a produção se manteve estável em torno de $38\% \pm 2,8$ até o tempo onze.

No início deste experimento as fermentações foram realizadas durante nove dias com base em estudos de Santos et al., (2013) que utilizaram cepas de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus* como agente bioconversor para fermentação, no entanto, pode ser considerado que o tempo de nove dias também é ideal para se atingir o pico de produção de proteínas por *Y. lipolytica* QU69 mas como já mencionado anteriormente, o processo poderia ser interrompido

aos três dias de experimento em que se atinge ganho significativo quanto ao incremento proteico.

4 CONCLUSÃO

Através dos experimentos realizados concluí-se que a levedura *Y. lipolytica* QU69 pode ser utilizada em processos de bioconversão. Os processos utilizados para a bioconversão no decorrer do experimento não apresentaram alto custo de investimento e são processos verdes, isto é, não foram utilizados reagentes que possam agredir o meio ambiente ou expor o manipulador a riscos de contaminação.

Dentre as condições testadas no estudo foi concluído que quando utilizada cascas de mandioca como fonte de carbono, em fermentação em banho com agitação tipo dubnoff a 100rpm, meio onde é adicionada uréia como fonte de nitrogênio e em temperatura de 40°C são alcançados os maiores resultados quanto a produção de proteínas.

A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono se mostrou viável e se apresentou como alternativa para agregar valor comercial a resíduos que quando descartados de maneira inadequada no meio ambiente podem acarretar problemas ao mesmo.

A levedura utilizada demonstrou alta eficiência no que se refere a produção de proteínas com diversas fontes de carbono e principalmente quando utilizado resíduos de casca de mandioca, a biomassa por possuir alto valor proteico poderá ser utilizada na alimentação animal com isso diminuir custos de produção.

5 REFERÊNCIAS

AHMED, S. U. et al. Fatty Acid Profiling During Microbial Lipid Production Under Varying pO₂ and Impeller Tip Speeds. *Applied Biochemistry And Biotechnology*, [s.l.], v. 151, n. 2-3, p.599-609, 26 jun. **2008**. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s12010-008-8261-9>.

AMORIM, L.; ROSA, P. D.; VALENTE, P. Extração lipídica em leveduras oleaginosas de queijo artesanal. Trabalho de graduação Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Dados não publicados em periódico indexado.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALITICAL CHEMISTS– AOAC. *Official Methods of Analysis*. 15.ed. Arlington, Virginia: 1117p.**1990**.

AUED-PIMENTEL, S.et al. Ácidos graxos saturados em produtos alimentícios: comparação de procedimentos na análise por cromatografia gasosa. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, 64(2):167-172, **2005**.

BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S.Environmental and industrial applications of *Yarrowialipolytica*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 84, n. 5, p.847-865, 8 ago. **2009**. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2156-8>.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiological*, Ottawa, v. 27, n. 8, p. 911-917, **1959**.

CHRISTOPHE, G.et al. Recent developments in microbial oils production: a possible alternative to vegetable oils for biodiesel without competition with human food. *Brazilian Archives Of Biology And Technology*, [s.l.], v. 55, n. 1, p.29-46, fev. **2012**. Fap UNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-89132012000100004>.

CSUTAK, O. et al. Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. *Agriculture And Agricultural Science Procedia*, [s.l.], v. 6, p.545-553, **2015**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.083>.

FAO. Banco de dados estatísticos. Disponível em <<http://www.fao.org/statistics/en/>>. Acesso em 12 mar. **2017**.

FARIA, P. B.et al. Processamento da casca de mandioca na alimentação de ovinos: desempenho, características de carcaça, morfologia ruminal e eficiência e econômica. *Revista Brasileira de Zootecnia: Sociedade Brasileira de Zootecnia*, Viçosa, v. 40, n. 12, p.2929-2937, **2011**.

GAO, C.et al. Pyruvate producing biocatalyst with constitutive NAD-independent lactate dehydrogenases. *Process Biochemistry*, [s.l.], v. 45, n. 12, p.1912-1915, dez. **2010**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.029>.

GAO, M.; SHI, Z. Process Control and Optimization for Heterologous Protein Production by Methylophilic *Pichia pastoris*. *Chinese Journal Of Chemical Engineering*, [s.l.], v. 21, n. 2, p.216-226, fev. **2013**. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541\(13\)60461-9](http://dx.doi.org/10.1016/s1004-9541(13)60461-9).

HAMZA, F. et al. Selenium nanoparticle-enriched biomass of *Yarrowia lipolytica* enhances growth and survival of *Artemia salina*. *Enzyme And Microbial Technology*, [s.l.], v. 106, p.48-54, nov. **2017**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.002>.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Standard Methods for Analysis of Oils, Fats and Derivatives. Blackwell Scientific Publications, 7th Edition; Method 2.301; Report of IUPAC Working Group WG 2/87; **1987**.

KITCHA, S.; CHEIRSILP, B. Screening of Oleaginous Yeasts and Optimization for Lipid Production Using Crude Glycerol as a Carbon Source. *Energy Procedia*, [s.l.], v. 9, p.274-282, **2011**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.egypro.2011.09.029>.

LEDESMA-AMARO, R. et al. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends In Biotechnology*, [s.l.], v. 34, n. 10, p.798-809, out. **2016**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>.

LEONEL, M.; CEREDA, M. Caracterização físico-química de algumas tuberosas amiláceas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 1, n. 22, p.65-69, abr. **2002**.

LIU, H.; JI, X.; HUANG, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 33, n. 8, p.1522-1546, dez. **2015**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>.

MACHADO J. F. R. S. et al. Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. *International Food Research Journal*, v. 22, p. 1253-1260, **2015**.

MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal Of Biotechnology*, [s.l.], v. 109, n. 1-2, p.63-81, abr. **2004**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.027>.

MATTANNA , P. et al. Lipid profile and antimicrobial activity of microbial oils from 16 oleaginous yeasts isolated from artisanal cheese. *Revista Brasileira de Biociências: Brazilian Journal of Biosciences*, Porto Alegre, v.12, n 2 p.121-126, abr./jun. **2014a**.

MATTANNA , P. et al. Enhancement of microbial oil production by alpha-linolenic acid producing *Yarrowia lipolytica* strains QU22 and QU137. *Food Science And Biotechnology*, [s.l.], v. 23, n. 6, p.1929-1934, dez. **2014b**. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10068-014-0263-5>.

POLI, J. S. et al. . Fatty acid methyl esters produced by oleaginous yeast *Yarrowia lipolytica* QU21: an alternative for vegetable oils. *Revista Brasileira de Biociências* (Online), v. 11, p.203-208, **2013**.

POLI, J. S. et al. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 161, p.320-326, jun. **2014**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.083>.

SANTOS et al., Detecção de lipase por cepa de *Rhizopus arrhizus* var. *arrhizus*. In: CONICBIO / CONBIO / SIMCBIO,. 2013, Recife - PE. Resumos Expandidos. Recife, v. 2, p. 1 – 11, **2013**.

SUTHERLAND, J.; CORNELISON, C.; CROW, S. CANDIDA. *Yarrowia lipolytica* (Candida lipolytica). *Encyclopedia Of Food Microbiology*, [s.l.], p.374-378, **2014**. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00056-2>.

VANDENBERGHE, L.P. et al. Solid-state fermentation for the synthesis of citric acid by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 74, n. 2, p.175-178, set. **2000**. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524\(99\)00107-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0960-8524(99)00107-8).

VENDRUSCOLO, F. et al. Tratamento biológico do bagaço de maçã e adição em dieta para alevinos. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, p.487-493, nov. **2008**.

VILLAS-BÔAS, S. G.; ESPOSITO, E. Bioconversão do bagaço de maçã: Enriquecimento nutricional utilizando fungos para produção de um alimento alternativo de alto valor agregado. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*, v.14, n.1, p.38-42, **2000**.

YANG, S. S. et al. Protein enrichment of sweet potato residue by solid state cultivation with mono na co-cultures of amylolytic fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 9, pp. 258-264. **1993**

ZHU, L.Y.; ZONG, M.H.; WU, H. Efficient lipid production with *Trichosporon fermentans* and its use for biodiesel preparation. *Bioresource Technology*, [s.l.], v. 99, n. 16, p.7881-7885, nov. **2008**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2008.02.033>.

ZHU, Q.; JACKSON, E. N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Current Opinion In Biotechnology*, [s.l.], v. 36, p.65-72, dez. **2015**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.010>.

ZINJARDE, S. S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 152, p.1-10, jun. **2014**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>.

6 CONCLUSÕES GERAIS

A metodologia desenvolvida onde foi associada a espectrometria UV-Vis com o uso da escala de McFarland para a padronização e preparo do inóculo se mostrou eficiente e apresenta vantagens devido à sua velocidade, simplicidade e maior exatidão em comparação para a técnica de contagem de colônias ou a comparação visual.

É possível utilizar a leitura da absorbância para estimar o número de células da levedura *Y. lipolytica* QU69 presentes em suspensões que serão utilizadas em bioprocessos, assim a estimativa das células se torna mais precisa, otimizando o tempo despendido para realizar a contagem em câmaras de Neubauer e diminuindo o erro que ocorre quando é realizada apenas a comparação visual com a escala padrão de McFarland.

Através dos estudos realizados nos processos de bioconversão concluí-se que a levedura *Y. lipolytica* QU69 pode ser utilizada em processos de bioconversão. As metodologias utilizadas para a bioconversão no decorrer do experimento não apresentaram alto custo de investimento e são processos verdes, isto é, não foram utilizados reagentes que possam agredir o meio ambiente ou expor o manipulador a riscos de contaminação.

A utilização de resíduos agroindustriais como fonte de carbono se mostrou viável e se apresentou como alternativa para agregar valor comercial a resíduos que quando descartados de maneira inadequada no meio ambiente podem acarretar problemas ao mesmo.

Dentre as condições testadas no estudo foi concluído que quando utilizada cascas de mandioca como fonte de carbono, em fermentação em banho com agitação tipo dubnoff a 100rpm, meio onde é adicionada uréia como fonte de nitrogênio e em temperatura de 40°C foi considerado o ideal para a maior produção de proteínas.

A levedura utilizada demonstrou alta eficiência no que se refere a produção de proteínas com diversas fontes de carbono e principalmente quando utilizado resíduos de casca de mandioca, a biomassa por possuir alto valor proteico poderá ser utilizada na alimentação animal com isso diminuir custos de produção.

7 REFERÊNCIAS GERAIS

ANUPAMA; RAVINDRA, P.. Value-added food. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 18, n. 6, p.459-479, out. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750\(00\)00045-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0734-9750(00)00045-8).

ARAÚJO, L. F. et al. Enriquecimento proteico de alimentos por levedura em fermentação semissólida: alternativa na alimentação animal. João Pessoa: *Tecnologia e Ciência Agropecuária*, v.3, n.3, p. 47-53, set., **2009**.

BANKAR, A. V.; KUMAR, A. R.; ZINJARDE, S. S.Environmental and industrial applications of *Yarrowialipolytica*. *Applied Microbiology And Biotechnology*, [s.l.], v. 84, n. 5, p.847-865, 8 ago. **2009**. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-009-2156-8>.

BARTH, G. e GAILLARDIN, C. Physiology and genetics of the dimorphic fungus *Yarrowia lipolytica*, *FEMS Microbiol. Rev.* Amsterdam. v. 19, n. 4, p. 219-237, 1997.

BELO, I. (Portugal). Sociedade Portuguesa de Ciotechnology. *Yarrowia lipolytica*: uma fábrica celular no contexto de biorrefinaria. *Biorrefinarias e Biotecnologia Industrial*, Braga, p.21-23, abr. **2013**. Quadrimestral.

BEOPOULOS, A.; CHARDOT, T.; NICAUD, J. *Yarrowia lipolytica*: A model and a tool to understand the mechanisms implicated in lipid accumulation. *Biochimie*, [s.l.], v. 91, n. 6, p.692-696, jun. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.02.004>.

CSUTAK, O. et al. Biotechnological Applications of *Yarrowia lipolytica* CMGB32. *Agriculture And Agricultural Science Procedia*, [s.l.], v. 6, p.545-553, **2015**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aaspro.2015.08.083>.

DOMÍNGUEZ, Á. et al. Non-conventional yeasts as hosts for heterologous protein production. *International Microbiology*, Salamanca - Espanha, v. 1, p.131-142, **1998**.

HAMZA, F.et al. Selenium nanoparticle-enriched biomass of *Yarrowia lipolytica* enhances growth and survival of *Artemia salina*. *Enzyme And Microbial Technology*, [s.l.], v. 106, p.48-54, nov. **2017**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2017.07.002>.

LEDESMA-AMARO, R. et al. Metabolic Engineering for Expanding the Substrate Range of *Yarrowia lipolytica*. *Trends In Biotechnology*, [s.l.], v. 34, n. 10, p.798-809, out. **2016**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.04.010>.

LIU, H.; JI, X.; HUANG, H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*, [s.l.], v. 33, n. 8, p.1522-1546, dez. **2015**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.07.010>.

MACHADO J. F. R. S. *et al.* Biomass production by *Yarrowia lipolytica* as a source of lipids: bench scale cultivation on raw glycerol-based medium. *International Food Research Journal*, v. 22, p. 1253-1260, **2015**.

MADZAK, C.; GAILLARDIN, C.; BECKERICH, J. Heterologous protein expression and secretion in the non-conventional yeast *Yarrowia lipolytica*: a review. *Journal Of Biotechnology*, [s.l.], v. 109, n. 1-2, p.63-81, abr. **2004**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2003.10.027>.

MORALES, E. M.; MIRANDA, J. C. ; ANGELIS, D. F. . Utilization of Agro-Industrial Residues as Substrate of Solid-State Fermentation. In: Abulude, F. Olawale; Ganguly, Subha. (Org.). Current trends in advancement of scientific research an opinion in applied microbiology an biotechnology: An introduction to readers. 1ed. Akure: *Science and education development Institute*, **2013**, v. 1, p. 59-71.

NELSON, D.L. COX, M.M. Princípios de Bioquímica de Lehninger. 5a Ed., p. 805-810, cap 2, 2011.

RAIMBAULT, M., Soccol, C.R. and Chuzel, G. (1998). International training course on solid state fermentation. Document ORSTOM, Montpellier France , n°1 ; pp. 204

RAJOKA, M. I, et. al.. Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. *Bioresource Technology*, v. 97, p. 1934-1941, **2006**.

REGULY, J. C. Biotecnologia dos processos fermentativos: produção de enzimas e engenharia das fermentações. Pelotas: Editora Universitária, 2000. 218 p.

ROEPCKE, C.b.s.; VANDENBERGHE, L.p.s.; SOCCOL, C.r.. Optimized production of *Pichia guilliermondii* biomass with zinc accumulation by fermentation. *Animal Feed Science And Technology*, [s.l.], v. 163, n. 1, p.33-42, jan. **2011**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2010.09.018>.

SUTHERLAND, J.; CORNELISON, C.; CROW, S. CANDIDA. *Yarrowia lipolytica* (*Candida lipolytica*). *Encyclopedia Of Food Microbiology*, [s.l.], p.374-378, **2014**. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-384730-0.00056-2>.

ZHU, Q.; JACKSON, E. N. Metabolic engineering of *Yarrowia lipolytica* for industrial applications. *Current Opinion In Biotechnology*, [s.l.], v. 36, p.65-72, dez. **2015**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2015.08.010>.

ZINJARDE, S. S. Food-related applications of *Yarrowia lipolytica*. *Food Chemistry*, [s.l.], v. 152, p.1-10, jun. **2014**. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.117>.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Resumos publicados

1. [SOUZA, F. A.](#); SILVA, V. G. ; BITENCOURT, T. B. . Use of McFarland standards and spectrophotometry for *Yarrowia lipolytica* QU69 cell counting. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2017 - Área: Microbiologia Industrial, 2017.

2. [SOUZA, F. A.](#); SILVA, H. B. ; SILVA, V. G. ; BITENCOURT, T. B. . Bioconversion of agroindustrial residues for protein production by *Yarrowia lipolytica* QU69. In: 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2017, Foz do Iguaçu. 29º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2017 - Área: Microbiologia Industrial, 2017.